บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการเพาะเชื้อ

ตัวอย่างปอดทุกตัวอย่างถูกนำมาเพาะเพื่อแยกเชื้อ *M. hyopneumoniae* เป็นหลัก เชื้อมัยโคพลาสมาที่เพาะได้จะทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และพิสูจน์เชื้อโดยวิธี growth inhibition test พบว่าสามารถแยกเชื้อ *M. hyopneumoniae* ได้จากปอดสุกรทั้งสิ้น 75 ตัวอย่าง คิดเป็น ร้อยละ 37.5 และเชื้อ *M. hyorhinis* 40 ตัวอย่าง คิดเป็น ร้อยละ 20 นอกจากการเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อพิเศษสำหรับเชื้อมัยโคพลาสมาแล้ว ยังได้ทำการหาเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นจากปอดโดยการเพาะลงบน 5% sheep blood agar ด้วย จึงสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียบางชนิดที่เป็นสาเหตุของโรคในระบบทางเดินหายใจสุกรได้อีกด้วย คือ *Actinobacillus pleuropneumoniae* 24 ตัวอย่าง, *Pasteurella multocida* 19 ตัวอย่าง, *Hemophilus parasuis* 1 ตัวอย่าง และเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 เชื้อมัยโคพลาสมาและแบคทีเรียที่เพาะได้จากตัวอย่างปอดสุกร

ชนิดของเชื้อ	จำนวนปอด	
	ตัวอย่าง	ร้อยละ
Mycoplasma hyopneumoniae	75	37.5
Mycoplasma hyorhinis	40	20.0
Actinobacillus pleuropneumoniae	24	12.0
Pasteurella multocida	19	9.5
Hemophilus parasuis	1	0.5
Actinomyces pyogenes	2	1
Streptococcus spp.	9	4.5
Staphylococcus spp.	6	3.0

จากผลข้างต้นพบว่าปอดสุกรมีทั้งที่พบเชื้อ *M. hyopnuemoniae* อย่างเดียว และพบเชื้อ *M. hyopnuemoniae* ร่วมกับแบคทีเรียอื่นด้วยคือ ปอดสุกรที่พบเชื้อ *M.hyopnuemoniae* ชนิดเดียว 55 ตัวอย่าง, พบเชื้อ *M. hyopnuemoniae* ร่วมกับ *Actinobacillus pleuropneumoniae* 3 ตัวอย่าง ร่วมกับ *P. multocida* 9 ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังพบร่วมกับเชื้อ *H. parasuis*, *Staphylococcus spp.* และ *Streptococcus spp.* 1, 2 และ 5 ตัวอย่างตามลำดับ

จากปอดสุกรทั้งสิ้น 200 ตัวอย่างที่มาจากฟาร์ม 12 ฟาร์ม พบว่าสามารถเพาะแยกเชื้อ *M. hyopnuemoniae* ได้จากทุกฟาร์ม และสามารถเพาะเชื้อจากปอดสุกรในแต่ละฟาร์มได้ประมาณ ร้อยละ5 - 70 ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2 แสดงอัตราการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* ในฟาร์มทั้ง 12 ฟาร์ม จากการเพาะเชื้อ

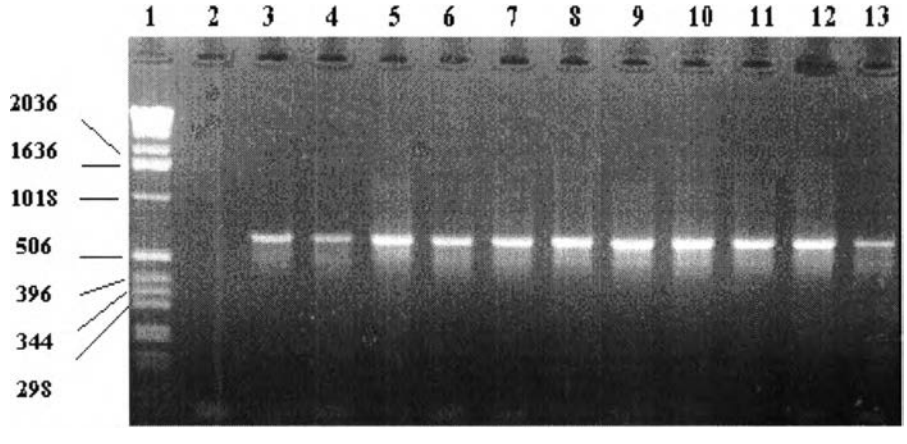
ฟาร์มที่	จำนวนสุกรที่ติดเชื้อ *M. hyopneumoniae*	
	ตัวอย่าง	ร้อยละ
1	10/20	50
2	11/20	55
3	6/20	30
4	10/20	50
5	9/20	45
6	1/20	5
7	1/10	10
8	3/10	30
9	6/20	30
10	6/10	60
11	5/20	25
12	7/10	70

4.2 ผลการทดสอบด้วยวิธีพีซีอาร์

4.2.1 การวัดคุณภาพเทคนิคพีซีอาร์ของห้องปฏิบัติการ

การทดสอบความจำเพาะของ primers พบว่าเมื่อทำพีซีอาร์กับตัวอย่างที่เป็นเชื้อ *M. hyopneumoniae* ทั้งสายพันธุ์อ้างอิงและสายพันธุ์ท้องถิ่น สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอในขนาดประมาณ 649 bp ทุกตัวอย่าง และไม่พบแถบดีเอ็นเอกับตัวอย่างเชื้อมัยโคพลาสมาและแบคทีเรียชนิดอื่นเลย ดังแสดงในภาพที่ 4-1 ก , ข และ ค

ภาพที่ 4-1 ก ผลการทดสอบความจำเพาะของ primers กับเชื้อ *M. hyopneumoniae*



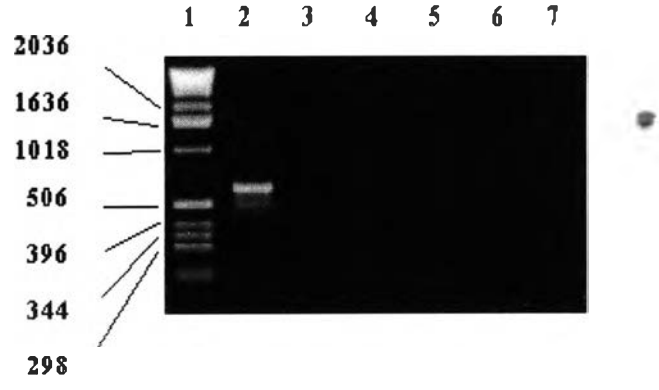
เลนที่ 1 1 Kb DNA ladder + *Hinf* I fragment of vector

เลนที่ 2 PCR mixture

เลนที่ 3 *M. hyopneumoniae* ATCC 25934

เลนที่ 4 - 13 *M. hyopneumoniae* สายพันธุ์ท้องถิ่น

ภาพที่ 4-1 ข ผลการทดสอบความจำเพาะของ primers กับเชื้อมัยโคพลาสมาต่างๆ



เลนที่ 1 1 Kb DNA ladder + *Hinf* I fragment of vector

เลนที่ 2 *M. hyopneumoniae* ATCC 25934

เลนที่ 3 *M. hyorhinis* PG 29

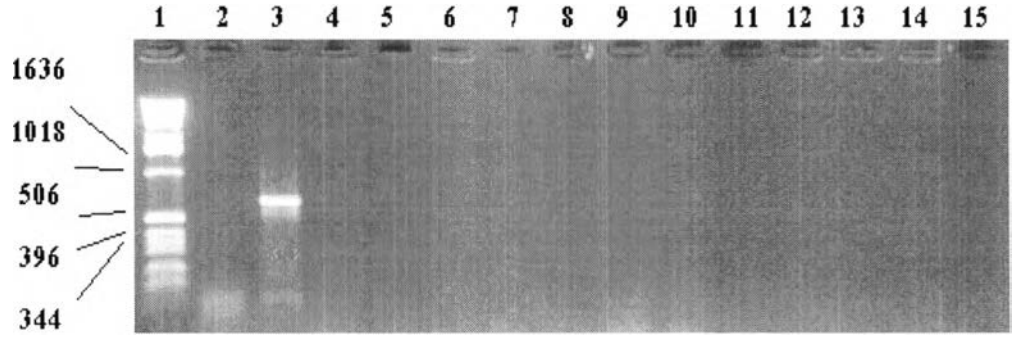
เลนที่ 4 *M. hyorhinis* BTS 7

เลนที่ 5 *M. hyosynoviae* PG 16

เลนที่ 6 *M. arginini* PG 230

เลนที่ 7 *Acholeplasma laidlawii* PG 8

ภาพที่ 4-1 ค ผลการทดสอบความจำเพาะของ primers กับเชื้อแบคทีเรียต่างๆ



เลนที่ 1 1 Kb DNA ladder + *Hinf* I fragment of vector

เลนที่ 2 PCR mixture

เลนที่ 3 *M. hyopneumoniae* ATCC 25934

เลนที่ 4 -5 *Actinobacillus pleuropneumoniae* Shope 4074 , sw 492/41

เลนที่ 6 *Actinomyces pyogenes* sw 97/1

เลนที่ 7 *Bordetella bronchiseptica* phage type

เลนที่ 8 - 9 *Erysipelotrix rhusiopathiae* ME 7, sw 545/36

เลนที่ 10-11 *Pasteurella multocida* Kobe, sw 1601/2

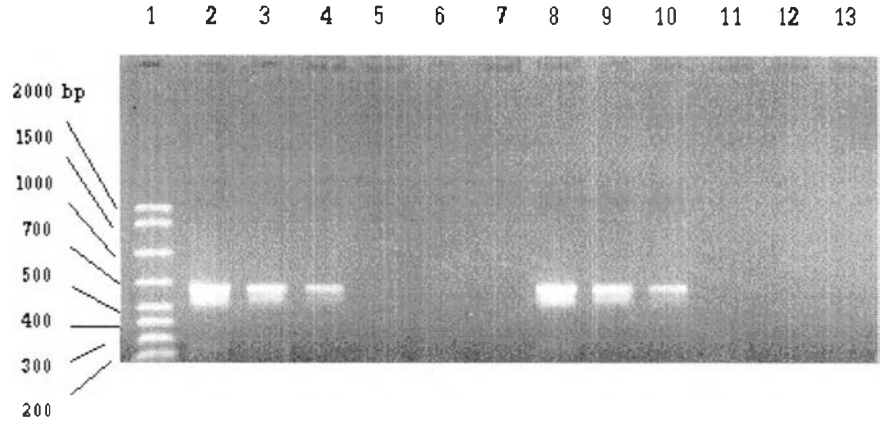
เลนที่ 12 *Klebsiella pneumoniae* sw 238/31

เลนที่ 13 *Staphylococcus aureus* Cowan 1

เลนที่ 14 - 15 *Streptococcus spp.* group r, group s

การทดสอบความไวของเทคนิคพีซีอาร์เมื่อเตรียมดีเอ็นเอตัวอย่างตามวิธีของ Kobayashi และคณะ (1996) พบว่าสามารถตรวจพบ PCR product ได้จากปอดที่มีเชื้อ *M. hyopneumoniae* ในระดับความเข้มข้นที่ 10^1 CFU/ ml ขึ้นไป ซึ่งได้แสดงไว้ในภาพที่ 4-2

ภาพที่ 4-2 ความไวของการตรวจตัวอย่างด้วยวิธีพีซีอาร์



เลนที่ 1 50-2000 bp DNA Ladder

เลนที่ 2-7 *M. hyopneumoniae* J strain 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10 CFU/ ml ในตัวอย่างปอด 1 กรัม ตามลำดับ

เลนที่ 8-13 *M. hyopneumoniae* b5 strain 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10 CFU/ ml ในตัวอย่างปอด 1 กรัม ตามลำดับ

4.2.2 ผลการหาลำดับเบส

PCR product ที่ได้จากการตรวจตัวอย่างปอด 4 ตัวอย่าง และจากเชื้ออ้างอิง 1 ตัวอย่าง รวม 5 ตัวอย่างที่ส่งไปยัง ศูนย์อณูชีววิทยา ศูนย์ปฏิบัติการเครื่องมือรวม มหาวิทยาลัยมหิดล อ. ศาลายา จ. นครปฐม พบว่าทุกตัวอย่างมีลำดับเบสที่เหมือนกันกับลำดับเบสของ PCR product ของเชื้อ *M. hyopneumoniae*

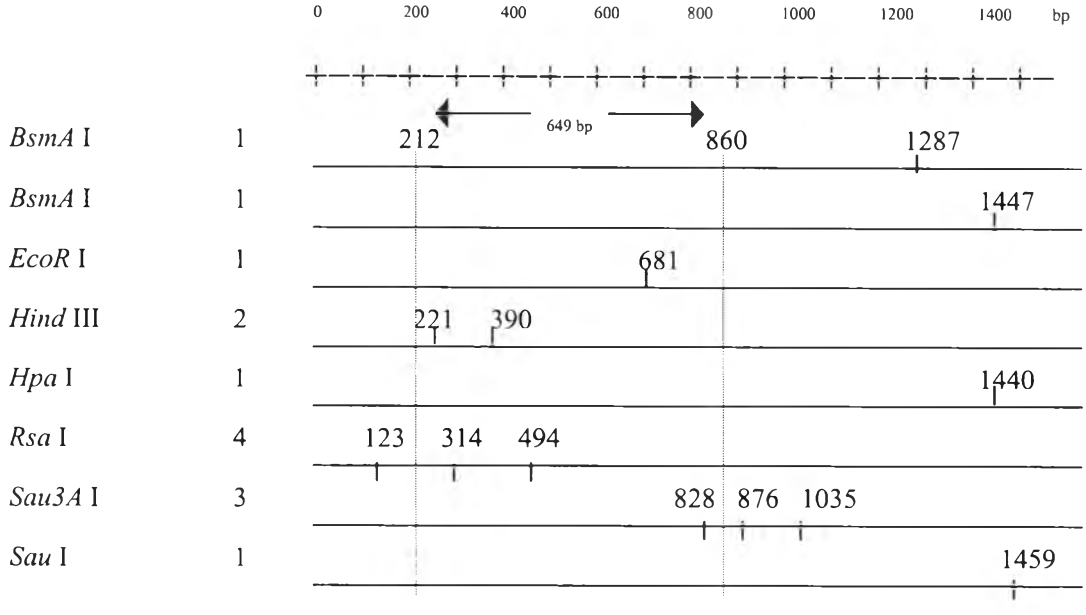
4.2.3 การคัดเลือกเอ็นไซม์ Restriction endonuclease

จากการใช้โปรแกรม DNASIS หาตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ต่างๆบน 16S rRNA ของ *M. hyopneumoniae* พบว่าเอ็นไซม์ที่เหมาะสมจะนำมาใช้ คือ *EcoR* I และ *Hind* III ซึ่งมีตำแหน่งตัดบน PCR product 1 และ 2 ตำแหน่งตามลำดับ ซึ่งทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตรวจสอบได้บน agarose gel electrophoresis เป็น 2 แถบที่มีขนาด 469 bp กับ 179 bp และ 169 bp กับ 470 bp ตามลำดับ ซึ่งรายละเอียดได้แสดงไว้ในตารางที่ 4-3 และภาพที่ 4-3

ตารางที่ 4-3 เอ็นไซม์ต่างๆที่มีจุดตัดบน 16S rRNA ของ *M. hyopneumoniae*

ชื่อเอ็นไซม์	ลำดับเบสที่มีการตัดของเอ็นไซม์	จำนวนจุดตัด	ตำแหน่งของจุดตัด
BsmA I	!GTCTC	1	1287
BsmA I	!GAGAC	1	1447
***EcoR* I**	**G!AATTC**	**1**	**681**
***Hind* III**	**A!AGCTT**	**2**	**221 390**
Hpa I	GTT!AAC	1	1440
Rsa I	GT!AC	4	123 314 494 1388
Sau3A I	!GATC	3	828 876 1035
Sau I	CC!TNAGG	1	1459

ภาพที่ 4-3 แสดงจุดตัดของเอ็นไซม์ต่างๆบน 16S rRNA ของ *M. hyopneumoniae*



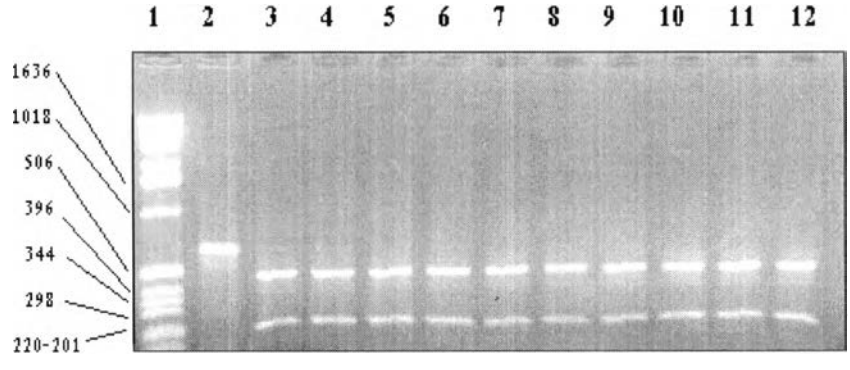
เอ็นไซม์ *BsmA* I, *Hpa* I และ *Sau* I มีจุดตัดบนดีเอ็นเอที่ไม่อยู่ในตำแหน่งของ PCR product จึงไม่สามารถนำมาใช้ได้ ในขณะที่ *Rsa* I และ *Sau3A* I มีจุดตัดบนดีเอ็นเอถึง 3จุด แต่อยู่ในตำแหน่งที่ไม่เหมาะสม ส่วนเอ็นไซม์ *EcoR* I มีจุดตัดที่เหมาะสมที่สุดคือ 1 ตำแหน่งใน ลำดับเบสที่ 681 ซึ่งจะทำให้ได้ชิ้นส่วนหลังการตัดมีขนาด 469 bp และ 179 bp ซึ่งตรวจได้ง่าย จากการทำ agarose gel electrophoresis และเอ็นไซม์ *Hind* III มีจุดตัดบน PCR product 2 ตำแหน่ง ที่จะทำให้ได้ชิ้นส่วนขนาด 9, 169 และ 470 bp แต่เมื่อตรวจดูด้วย agarose gel electrophoresis จะพบชิ้นส่วนได้ 2 ส่วนหลังเท่านั้น เนื่องจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 9 bp มีขนาดเล็กมากไม่สามารถทำให้เห็นได้พร้อมกันกับชิ้นส่วนที่เหลือ และเมื่อทำการตัดด้วยเอ็นไซม์ทั้งสองชนิดร่วมกัน จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นที่ถูกตัดทั้งสิ้น 4 ชิ้นคือ ขนาด 9, 169, 291 และ 179 bp ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำมาตรวจดูด้วย agarose gel electrophoresis จะสังเกตเห็นชิ้นส่วนได้เพียง 2 ตำแหน่ง คือ ที่ขนาด 291 bp 1แถบ กับอีก 1 แถบของชิ้นส่วน 169 และ 179 bp ที่อยู่ชิดกันมาก ไม่สามารถแยกได้จากการตรวจด้วยวิธีนี้ ส่วนชิ้นส่วนขนาด 9 bp จะเล็กมากจนตรวจสอบไม่ได้เช่นกัน

4.2.4 การตัดด้วยเอ็นไซม์ Restriction endonuclease

PCR product ที่ได้จะนำมาตรวจสอบความถูกต้องโดยการตัดด้วยเอ็นไซม์ *EcoR* I และ *Hind* III พบว่าทุกตัวอย่างให้ชิ้นส่วนหลังการตัดที่เหมือนกับ PCR product ของ *M. hyopneumoniae* ทั้งสิ้น นั่นคือ PCR product ทุกตัวอย่างที่ได้จากการทำพีซีอาร์มีความถูกต้องเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *M. hyopneumoniae* จริง (ภาพที่ 4-4)

ภาพที่ 4-4 แสดงชิ้นส่วนของ PCR product หลังจากทำการตัดด้วย *EcoR* I (ก) , *Hind* III (ข) และ *EcoR* I + *Hind* III (ค)

(ก)

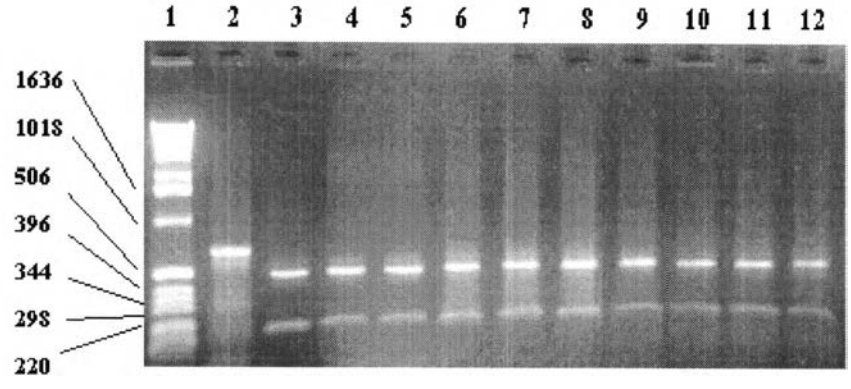


เลนที่ 1 1 Kb DNA ladder + *Hinf* I fragment of vector

เลนที่ 2 uncut PCR product

เลนที่ 3-12 PCR product ที่ได้จากการตรวจตัวอย่างปอดตัดด้วยเอ็นไซม์ *EcoR* I

(ข)

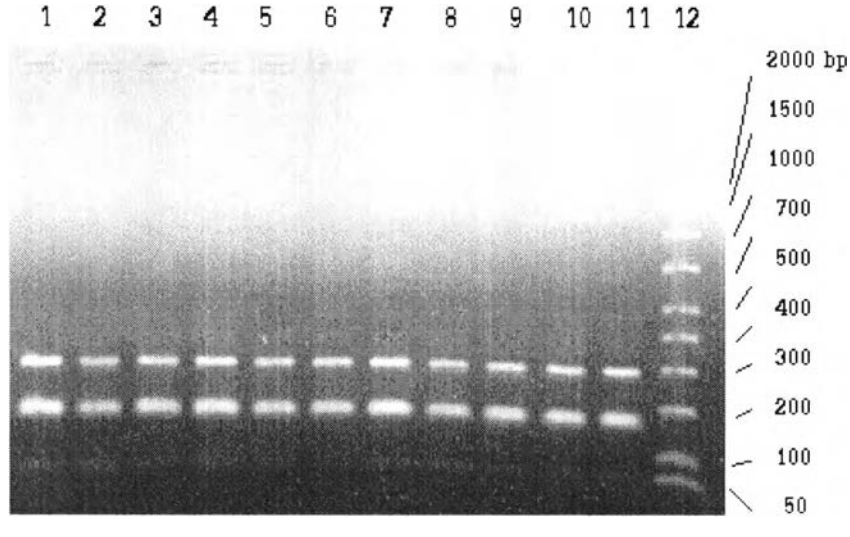


เลนที่ 1 1 Kb DNA ladder + *Hinf* I fragment of vector

เลนที่ 2 uncut PCR product

เลนที่ 3-12 PCR product ที่ได้จากการตรวจตัวอย่างปอด ตัดด้วย เอ็นไซม์ *Hind* III

(ค)



เลนที่ 1-11 PCR product ที่ได้จากตัวอย่างปอด ตัดด้วยเอ็นไซม์ *EcoR* I และ *Hind* III

เลนที่ 12 50-2000 bp DNA Ladder

4.2.5 การวิเคราะห์ผลพีซีอาร์

จากปอดสุกร 200 ตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ มีตัวอย่างที่ให้ผลบวก คือ เกิด PCR product 132 ตัวอย่าง คิดเป็น ร้อยละ 66 และจากฟาร์ม 12 ฟาร์มพบว่าทุกฟาร์มมีการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* จำนวนปอดสุกรที่ให้ผลบวกในแต่ละฟาร์มคิดเป็น ร้อยละ 30-100 ดังแสดงในตารางที่ 4-4

ตารางที่ 4-4 แสดงอัตราการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* จากฟาร์มทั้ง 12 ฟาร์ม โดยวิธีพีซีอาร์

ฟาร์มที่	จำนวนสุกรที่ติดเชื้อ *M. hyopneumoniae*	
	ตัวอย่าง	ร้อยละ
1	18/20	90
2	12/20	60
3	6/20	30
4	10/20	50
5	15/20	75
6	14/20	70
7	6/10	60
8	10/10	100
9	9/20	45
10	9/10	90
11	14/20	70
12	9/10	90

4.3 ผลการตรวจรอยโรคตาเปล่าและจุลพยาธิวิทยา

จากตัวอย่างปอด 200 ตัวอย่าง พบปอดที่มีรอยโรคตาเปล่า cranioventral pneumonia ถึง 128 ตัวอย่าง คิดเป็น ร้อยละ 64 มีรอยโรคจากการตรวจจุลพยาธิวิทยา lymphocytic infiltration 18 ตัวอย่าง (ร้อยละ 9) และ hyperplastic lymphoid nodules 187 ตัวอย่าง (ร้อยละ 93.5) ดังแสดงในตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4-5 แสดงจำนวนปอดสุกรที่มีรอยโรค Mycoplasma- like lesions

การตรวจ	ลักษณะรอยโรค	จำนวนปอด	
		ตัวอย่าง	ร้อยละ
ตาเปล่า	no lesion	72	36.0
	cranioventral pneumonia	128	64.0
จุลพยาธิวิทยา	no lesion	8	4.0
	lymphocyte infiltration	18	9.0
	hyperplastic lymphoid nodules	187	93.5

จากการตรวจรอยโรคด้วยตาเปล่าและจุลพยาธิวิทยาในตัวอย่างปอดทั้งสิ้น 200 ตัวอย่าง ได้ผลดังนี้ คือ พบตัวอย่างปอดที่มีรอยโรคของการติดเชื้อมัยโคพลาสมาทั้งสิ้น 192 ตัวอย่าง คิดเป็น ร้อยละ 96 และปอดที่ไม่มีรอยโรคของการติดเชื้อมัยโคพลาสมา 8 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 4 ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 4-6

ตารางที่ 4-6 ผลการติดเชื้อมัยโคพลาสมาจากการตรวจรอยโรคด้วยตาเปล่าและจุลพยาธิวิทยา

ผลการตรวจรอยโรคตาเปล่าและจุลพยาธิวิทยา	จำนวนปอด	
	ตัวอย่าง	ร้อยละ
ตัวอย่างปอดที่มีรอยโรค Mycoplasma- like	192	96.0
ตัวอย่างปอดที่ไม่มีรอยโรค Mycoplasma- like	8	4.0
รวม	200	100

และจาก 12 ฟาร์มที่ทำการสำรวจพบว่า มีการติดเชื้อมัยโคพลาสมาทุกฟาร์ม โดยมีสุกรที่ติดเชื้อประมาณ ร้อยละ 85-100 ทุกฟาร์ม ซึ่งสรุปไว้ในตารางที่ 4-7

ตารางที่ 4-7 แสดงอัตราการติดเชื้อมัยโคพลาสมาในฟาร์มทั้ง 12 ฟาร์ม จากการตรวจรอยโรคตาเปล่าและจุลพยาธิวิทยา

ฟาร์มที่	จำนวนสุกรที่ติดเชื้อ *M. hyopneumoniae*	
	ตัวอย่าง	ร้อยละ
1	19/20	95
2	18/20	90
3	19/20	95
4	19/20	95
5	20/20	100
6	20/20	100
7	10/10	100
8	10/10	100
9	20/20	100
10	10/10	100
11	17/20	85
12	10/10	100

นอกจากรอยโรคที่แสดงถึงการติดเชื้อมัยโคพลาสมาแล้ว ยังพบว่าปอดสุกรมีรอยโรคอื่นๆ คือพบปอดมีรอยโรค abscess ถึง 34 ตัวอย่าง คิดเป็น ร้อยละ 17.5 ซึ่งในจำนวนนี้เป็นปอดที่มีรอยโรคทั้ง cranioventral pneumonia และ abscess ถึง 16 ตัวอย่าง พบปอดที่มีรอยโรค pleuritis จำนวน 40 ตัวอย่าง และ lung edema จำนวน 22 ตัวอย่าง ดังแสดงไว้ใน ตารางที่ 4-8

ตารางที่ 4-8 รอยโรคตาเปล่าจากการติดเชื้อต่างๆ

รอยโรค	จำนวนปอด	
	ตัวอย่าง	ร้อยละ
Cranioventral pneumonia	128	64.0
Abscess	34	17.0
Cranioventral pneumonia + abscess	16	8.0
Pleuritis	40	20.0
Lung edema	22	11.0

4.4 การวินิจฉัยการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae*

การวินิจฉัยการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* ในการสำรวจครั้งนี้ จะได้จากการตรวจการติดเชื้อ 3 วิธี คือ การตรวจรอยโรคตาเปล่าและจุลพยาธิวิทยา, การเพาะเชื้อ และการใช้เทคนิคพีซีอาร์ แล้วนำผลของทั้งสามวิธีมาวิเคราะห์ร่วมกัน พบว่าตัวอย่างปอดสุกรจาก 200 ตัวอย่าง มีการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* ทั้งสิ้น 147 ตัวอย่าง คิดเป็น ร้อยละ 73.5 และไม่ติดเชื้อ 53 ตัวอย่าง คิดเป็น ร้อยละ 26.5 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจโดยวิธีใดวิธีเดียวจะให้ผลที่แตกต่างกัน คือ ผลการตรวจรอยโรคตาเปล่าและจุลพยาธิวิทยาอย่างเดียวมีการติดเชื้อสูงถึง 192 ตัวอย่าง คิดเป็น ร้อยละ 96 , ผลการเพาะเชื้ออย่างเดียวมีการติดเชื้อเพียง 75 ตัวอย่างหรือ ร้อยละ 37.5 และผลการทำพีซีอาร์เพียงอย่างเดียวมีการติดเชื้อ 132 ตัวอย่างหรือ ร้อยละ 66 ดังแสดงใน ตารางที่ 4-9 และจากการวินิจฉัยการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* สามารถสรุปผลการติดเชื้อในฟาร์ม 12 ฟาร์มได้ คือ ฟาร์มทั้งหมดมีการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* และมีจำนวนสุกรที่ติดเชื้ออยู่ในระหว่าง ร้อยละ 40-100 ดังแสดงในตารางที่ 4-10

ตารางที่ 4-9 สรุปผลการวินิจฉัยการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* จากตัวอย่างปอดสุกร

การวิเคราะห์ผล	จำนวนปอด	
	ตัวอย่าง	ร้อยละ
ปอดที่ติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* จากการตรวจรอยโรคตาเปล่าและจุลพยาธิ	192	96.0
ปอดที่ติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* จากการเพาะเชื้อ	75	37.5
ปอดที่ติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* จากเทคนิคพีซีอาร์	132	66.0
ปอดที่ติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* จากการวิเคราะห์ผลร่วมกันทั้ง 3 วิธี	147	73.5

ตารางที่ 4-10 ผลการวินิจฉัยการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* ในตัวอย่างปอดสุกร จากฟาร์ม 12 ฟาร์ม

ฟาร์มที่	อัตราการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae*	
	ตัวอย่าง	ร้อยละ
1	19/20	95
2	14/20	70
3	8/20	40
4	15/20	75
5	15/20	75
6	14/20	70
7	6/10	60
8	10/10	100
9	13/20	65
10	10/10	100
11	13/20	65
12	10/10	100
รวม	147/200	73.5

4.5 ความสัมพันธ์ของผลการตรวจโดยวิธีต่าง ๆ

ผลการตรวจทั้งสามวิธีสามารถนำมาหาความสัมพันธ์เพื่อประเมินความสามารถในการตรวจการติดเชื้อแต่ละวิธี พบว่าปอดที่ให้ผลบวกกับการตรวจทั้งสามวิธีมีจำนวน 54 ตัวอย่าง โดยที่เป็นปอดที่มีรอยโรคทั้งตาเปล่าและจุลพยาธิวิทยา 42 ตัวอย่าง เป็นปอดที่มีแต่รอยโรคจุลพยาธิวิทยา 12 ตัวอย่าง ตัวอย่างปอดที่มีรอยโรคจุลพยาธิวิทยาที่เพาะเชื้อ *M. hyopneumoniae* ได้แต่ไม่เกิด PCR product มีจำนวน 8 ตัวอย่าง ในขณะที่ปอดที่มีรอยโรคตาเปล่าและจุลพยาธิวิทยาที่เกิด PCR product โดยที่ไม่สามารถเพาะเชื้อได้มีจำนวน 54 ตัวอย่าง ปอดที่ให้ผลลบกับการตรวจหารอยโรคตาเปล่าและจุลพยาธิวิทยาแต่ให้ผลบวกกับการเพาะเชื้อและพีซีอาร์ มีจำนวน 4 ตัวอย่าง ให้ผลบวกกับการเพาะเชื้ออย่างเดียว 1 ตัวอย่าง และให้ผลบวกกับการทำพีซีอาร์ 2 ตัวอย่าง ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 4-11

ตารางที่ 4-11 ความสัมพันธ์ของการเกิดรอยโรคกับการเพาะเชื้อและวิธีพีซีอาร์

รอยโรค	ผลการเพาะเชื้อ และพีซีอาร์ (ตัวอย่าง)				รวม
	เพาะเชื้อ + PCR +	เพาะเชื้อ + PCR -	เพาะเชื้อ - PCR +	เพาะเชื้อ - PCR -	
รอยโรคตาเปล่า + รอยโรคจุลพยาธิวิทยา +	42	8	54	24	128
รอยโรคตาเปล่า - รอยโรคจุลพยาธิวิทยา +	12	8	18	26	64
รอยโรคตาเปล่า - รอยโรคจุลพยาธิวิทยา -	4	1	2	1	8
รวม	58	17	74	51	200

จากการหาความสัมพันธ์ของการพบรอยโรคกับการเพาะเชื้อพบว่า ตัวอย่างปอดสุกรที่มีรอยโรค Mycoplasma- like และสามารถเพาะเชื้อได้ทั้ง *M. hyopneumoniae* และ *M. hyorhinis* มีจำนวน 5 ตัวอย่าง เพาะได้เชื้อ *M hyopneumoniae* ชนิดเดียว 65 ตัวอย่าง และเพาะได้เชื้อ *M. hyorhinis* ชนิดเดียว 35 ตัวอย่าง ในขณะที่เพาะเชื้อไม่ได้เลย 87 ตัวอย่าง ส่วนตัว

อย่างปอดสุกรที่ไม่มีรอยโรค Mycoplasma–like ซึ่งมีจำนวน 8 ตัวอย่าง สามารถเพาะเชื้อ *M. hyopneumoniae* ได้ 5 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 4-12

ตารางที่ 4-12 ความสัมพันธ์ของการพบรอยโรคกับการเพาะแยกเชื้อ *M.hyopneumoniae* และ *M. hyorhinis*

รอยโรค	ผลการเพาะเชื้อ *M. hyopneumoniae* (M hp) และ *M. hyorhinis* (M hr) (ตัวอย่าง)			
	M. hp + M. hr +	M. hp + M. hr -	M. hp - M. hr+	M. hp - M. hr -
รอยโรค Mycoplasma – like +	5	65	35	87
รอยโรค Mycoplasma – like -	0	5	0	3

ความสัมพันธ์ของผลการทำพีซีอาร์กับการเพาะแยกเชื้อมีดังนี้ คือ ตัวอย่างปอดที่เกิด PCR product พร้อมกับสามารถเพาะเชื้อได้ทั้ง *M. hyopneumoniae* และ *M. hyorhinis* มีจำนวน 4 ตัวอย่าง เพาะได้แต่เชื้อ *M. hyopneumoniae* 54 ตัวอย่าง เพาะได้แต่เชื้อ *M. hyorhinis* 27 ตัวอย่าง และเพาะเชื้อไม่ได้เลย 47 ตัวอย่าง ปอดที่ไม่เกิด PCR product แต่เพาะเชื้อทั้งสองชนิดได้มี 1 ตัวอย่าง เพาะได้แต่เชื้อ *M. hyopneumoniae* 16 ตัวอย่าง เพาะได้แต่เชื้อ *M. hyorhinis* 8 ตัวอย่าง และเพาะเชื้อไม่ได้เลย 43 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 4-13

ตารางที่ 4-13 ความสัมพันธ์ของผลการทำพีซีอาร์กับการเพาะเชื้อ *M. hyopneumoniae* และ *M. hyorhinis*

ผลพีซีอาร์	ผลการเพาะเชื้อ *M. hyopneumoniae* (M. hp)และ *M. hyorhinis* (M. hr) (ตัวอย่าง)			
	M. hp + M. hr +	M. hp + M. hr -	M. hp - M. hr+	M. hp - M. hr -
เกิด PCR product	4	54	27	47
ไม่เกิด PCR product	1	16	8	43

4.6 ผลการประเมินวิธีการตรวจการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae*

จากข้อมูลการตรวจการติดเชื้อทั้งจากสามวิธีและจากการวิเคราะห์ผลร่วมที่ถือเป็นเกณฑ์ในการสำรวจครั้งนี้ ทำให้ประเมินได้ว่าในการตรวจการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* ที่ใช้การตรวจรอยโรคตาเปล่า ที่เรียกว่าการทำ gross inspection พบปอดที่ให้ผลบวก 128 ตัวอย่าง ในจำนวนนั้นมีผลบวกจริง 104 ตัวอย่าง จำนวนปอดที่ให้ผลลบจริง 29 ตัวอย่าง การตรวจโดยการทำ gross inspection จึงมีความไว (sensitivity) ร้อยละ 70.7 และมีความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 54.7 เมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจรอยโรคทั้งตาเปล่าและจุลพยาธิวิทยาร่วมกัน พบว่าตัวอย่างปอดที่ให้ผลบวกกับการตรวจนี้มี 192 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นผลบวกจริง 142 ตัวอย่าง และเป็นตัวอย่างที่ให้ผลลบจริง 3 ตัวอย่าง การตรวจด้วยวิธีนี้จึงมีความไว ร้อยละ 96.6 และมีความจำเพาะ ร้อยละ 5.7 ในขณะที่วิธีการเพาะเชื้อให้ผลบวกหรือเพาะเชื้อได้เพียง 75 ตัวอย่างจากตัวอย่างที่ตัดสินว่าติดเชื้อ 147 ตัวอย่าง วิธีเพาะเชื้อจึงมีความไวในการตรวจ ร้อยละ 51 และมีความจำเพาะ ร้อยละ 100 ส่วนเทคนิคพีซีอาร์ มีตัวอย่างที่ให้ผลบวกจริง 130 ตัวอย่าง จาก 147 ตัวอย่าง ดังนั้นวิธีพีซีอาร์จึงมีความไว ร้อยละ 88.4 และมีความจำเพาะ ร้อยละ 96.2 (ตารางที่ 4-14)

ตารางที่ 4-14 ความจำเพาะและความไวในการตรวจการติดเชื้อ *M. hyopneumoniae* โดยวิธีต่างๆ

การตรวจวิธีต่าง ๆ	ผลการวินิจฉัยร่วม N = 200	
	ผลบวก	ผลลบ
การตรวจรอยโรคตาเปล่า (gross inspection)		
ผลบวก	104	24
ผลลบ	43	29
	147	53
	sensitivity 70.7%	specificity 54.7%
การตรวจรอยโรคตาเปล่าและจุลพยาธิวิทยา		
ผลบวก	142	50
ผลลบ	5	3
	144	53
	sensitivity 96.6%	specificity 5.7%
การเพาะเชื้อ (cultivation)		
ผลบวก	75	0
ผลลบ	72	53
	147	53
	sensitivity 51%	specificity 100%
การทำพีซีอาร์ (polymerase chain reaction)		
ผลบวก	130	2
ผลลบ	17	51
	147	53
	sensitivity 88.4%	specificity 96.2%